

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO,

Method for producing undecane-1,11-bicarboxylic acid by microorganism fermenting synchronously

Patent Number : **CN1162644**

International patents classification : C12P-007/44 C12N-001/14

• **Abstract :**

CN1162644 A NOVELTY - A synchronous microbe fermentation process for producing undecane 1,11-dicarboxylic acid (DC13) with high output from n-tridecane (nC13), is new.

DETAILED DESCRIPTION - A synchronous microbe fermentation process for producing undecane 1,11-dicarboxylic acid (DC13) with high output from n-tridecane (nC13) features that after the mutational strain resultant from Candidatropicalis is inoculated to culture medium whose matrix is different normal alkanes containing C11-C18, its main action is to grow thallus within 28 hrs, generating a certain quantity of biatomic acid by controlling pH value under 6.8, then to generate acid while growing a certain amount of thallus in 28-60 hrs by controlling pH value under 7.3, and finally to quickly generate different biatomic acids after 60 hrs by controlling pH value to 7.5-7.8. When the process is used to produce DC13 by fermentation in 2.5 cu.m fermentator, the DC13 content is high up to 205 g/l in 161 hrs, the transform rate is 94% and the purity of DC13 is 96-97%. (Dwg.0/0)

• **Publication data :**

Patent Family : CN1162644 A 19971022 DW2003-58 C12P-007/44 * AP: 1997CN-0103876 19970404
Priority n° : 1997CN-0103876 19970404
Covered countries : 1
Publications count : 1

• **Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (MICR-) MICROORGAN INST CHINESE ACAD SCI
Inventor(s) : CHEN Y; HAO X; PANG Y

• **Accession codes :**

Accession N° : 2003-608538 [58]
Sec. Acc. n° CPI : C2003-165961

• **Derwent codes :**

Manual code : CPI: D05-A04 D05-C09
E10-C02D2 E11-M
Derwent Classes : D16 E17

• **Update codes :**

Basic update code :2003-58

Others :

API Access. Nbr

API P200320466

UP4

2003-09

[19]中华人民共和国专利局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97103876.7

[51] Int. Cl.⁶

C12P 7/44

C12N 1/14 C12P 7/44

// C12R 1:74

[43] 公开日 1997 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1162644A

[22] 申请日 97.4.4

[71] 申请人 中国科学院微生物研究所

地址 100080 北京市中国科学院微生物研究所

[72] 发明人 陈远童 庞月川 郝秀珍

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 微生物同步发酵正十三烷生产十一烷
1,11 二羧酸方法

[57] 摘要

本发明公开了一种利用微生物同步发酵正十三烷 (nC_{13}) 高产十一烷 1, 11 一二羧酸 (DC_{13}) 的方法。所用微生物为一株热带假丝酵母 (*Candidatropicalis*) 优良生产突变株 P-12-242。其特点是: 在微生物菌种接入含有 C_{11} — C_{18} 各种正烷烃为基质的培养基后, 28 小时内, pH 控制在 6.8 以下, 以菌体生长为主, 产生一定数量二元酸; 28—60 小时, pH 控制在 7.3 以下, 以产酸为主, 增长一定量菌体; 60 小时以后 pH 控制在 7.5—7.8, 迅速生产各种二元酸。当本方法用于 nC_{13} 发酵生产 DC_{13} 时, 在 $2.5m^3$ 发酵罐内, 161 小时, DC_{13} 高达 $205g/L$, 转化率达到 94%, DC_{13} 的纯度达到 96—97%。

(BJ) 第 1456 号

权利要求书

1. 一种利用微生物同步发酵正烷烃生产 $C_{11}-C_{18}$ 各种长链 α, ω -二元酸的方法，其特征在于以正十三烷 (nC_{13}) 为基质的培养基中，用热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) P-12-242，即 CGMCC NO. 0297 发酵，然后回收所形成的二元酸。
2. 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) P-12-242 即 CGMCC NO. 0297 菌株。

说明书

微生物同步发酵正十三烷生产十一烷 1,11-二羧酸方法

本发明涉及微生物同步发酵正烷烃生产长链 α, ω -一二元酸的方法, 尤其是发酵正十三烷(nC_{13})高产十一烷 1, 11-二羧酸(DC_{11})的方法。

C_{10} 以上的长链二元酸是化工上合成高级香料, 高级尼龙工程塑料, 高档服装用尼龙热熔胶, 高温电介质, 高级涂料, 润滑油添加剂和耐寒性增塑剂等的重要原料。尤其是十三碳二元酸(DC_{13})和十五碳二元酸(DC_{15}), 它们分别是合成日用香料麝香 T 和名贵香料麝香酮的重要原料。

C_{10} 以上的长链二元酸, 在自然界中不单独存在, 只有少数几种二元酸可从植物油中裂介制取, 例如癸二酸(DC_{10})可从蓖麻籽油裂介制取; DC_{11} 可从菜籽油中抽提出甘油芥酸酯再用臭氧氧化方法生产; DC_{13} 可从蒜头果油中的脑神经酸裂介制取。但它们都受农田和气候的限制, 远不能满足需要。化工上至今也还没有经济可行的合成路线和方法。微生物学家应用生物工程技术, 利用微生物发酵石油中的正构烷烃生产相应链长的二元酸, 弥补了化工上的不足, 开辟了长链二元酸的新来源。

七十年代以前, 各国科学家对微生物发酵生产二元酸的研究, 只处于理论研究阶段, 所产生和积累的二元酸也都是十个碳以下的短链二元酸, 七十年代以后, 进入应用研究阶段, 通过大量的菌种诱变筛选, 培育出一批新突变菌株, 能从十个碳以上的正烷烃产生和积累与基质链长相同的长链二元酸, 并通过不断的培育和代谢调控研究, 使每升发酵液中二元酸的积累从开始时的几克, 十几克, 几十克提高到目前的一百多克和二百克左右。

八十年代以来, 二元酸的研究进入小规模工业生产阶段, 并出现了几个有实际生产价值的专利文献。中国专利 87105445.0, CN 1046757A, CN1092108A 和 CN 1130685A 分别提出生产长链 α, ω -一二元酸的方法, 特别是分别高产 DC_{16} , DC_{17} , DC_{15} 和 DC_{12} 的方法。在 16 升自动控制罐中, 发酵 5 天, DC_{16} 为 123g/L, 发酵 6 天, DC_{17} 为 133g/L, 在 2.5m³ 通用式发酵罐中, 发酵 6 天, DC_{15} 为 178g/L, 在 3m³ 发酵罐中, 发酵 5 天, DC_{12} 为 145g/L。

对 DC_{13} 的研究, 日本矿业株式会社率先工业放大, 1984 年建成年产 200

吨的DC₁₃的工业发酵装置,并投入生产。中国专利CN 1071951A 提出一种微生物异步发酵生产长链 α , ω -二元酸的方法,尤其是生产DC₁₃的方法。其方法是分两步进行,根据实验例4,第一步是把培养好的600升菌种液接入装有正十三烷(nC_{13})125升和培养基1775升的3m³发酵罐内(即装液量为83%),控制PH在4.5 \pm 0.1,繁殖培养菌体,24小时,菌体浓度达到8.7%(湿菌重);第二步,补加20%(V/V)的 nC_{13} ,调PH至7.8 \pm 0.1,转入发酵产酸阶段,发酵72小时,DC₁₃达到98.2 g/L,继续发酵72小时,产酸达到166.3g/L(从接种开始到发酵结束,共168小时),转化率为84%。

本发明的目的是提出另一种利用微生物同步发酵正烷烃生产C₁₁-C₁₈长链 α , ω -二元酸的方法,尤其是高产DC₁₃的方法。

本发明所用的菌株为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) P-12-242,是以一株氧化正烷烃生产混合二羧酸的热带假丝酵母(参见《微生物学报》20(1): 88—93, 1980)为出发菌株,通过亚硝酸和紫外线的多次反复诱变筛选培育出来的,能从C₁₁-C₁₈的各种单一正烷烃和混合正烷烃,尤其是正十三烷,高产出地生产相应链长的二羧酸。热带假丝酵母P-12-242(以下简称P-12-242)保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为:CGMCC NO. .

P-12-242的生理特性如下:

- 一、糖类的发酵: 葡萄糖+, 半乳糖+, 蔗糖+, 麦芽糖+, 乳糖-。
 - 二、同化: 葡萄糖+, 半乳糖+, 山梨糖-, 蔗糖+, 麦芽糖+, 纤维二糖+, 海藻糖+, 乳糖-, 密二糖-, 棉子糖-, 松三糖+, 菊芋糖-, 可溶性淀粉+, 木糖+, L-阿戊糖+, D-阿戊糖-, 核糖-, 鼠李糖-, α -甲基葡萄糖苷+, 甘油+, 乙醇+, 赤藓醇-, 甘露醇+, 肌醇-, 核糖醇+, 半乳糖醇-, 葡萄糖醇+, 柠檬酸钠-, 丁二酸钠+, 乳酸钙-。
 - 三、生长素的需要: 生物素++, 维生素B₁++, 维生素B₂+, 维生素B₆+, 维生素B₁₂+, 叶酸+, 烟酸+, 泛酸+, 肌醇+, 对氨基苯甲酸+。
 - 四、其它: 硝酸盐-, 冻化牛奶-, 熊果酸分解-, 凝固牛奶-, 油脂酶-。
- 形态特征: 奶油白色, 皱褶型, 菌落为蛋糕状和桃酥状。

培养特征:

在麦芽汁液体培养基中培养时,假菌丝多而长;在烷烃种子培养基中

培养时，有一定数量的短假菌丝；而在发酵培养基中发酵时，大部分是单个椭圆细胞。

本发明的种子培养基：

- (1)、10个巴林糖度的麦芽汁加2%琼脂制成的固体斜面；
- (2)、10个巴林的麦芽汁液体培养基；
- (3)、烷烃种子培养基包含： KH_2PO_4 6—12g/L，玉米浆 3—8g/L，酵母膏 3—8g/L，蔗糖 3—8g/L，尿素 3—6g/L，重蜡 40—70ml/L，自来水配制，自然PH。

培养种子的过程为：取一接种环 P—12—242 酵母菌体，涂布在麦芽汁固体斜面上（15×180 试管，每支装 6—7mL 培养基，放成斜面），于 28—30℃ 培养 40 小时。取一支上述培养好的 P—12—242 菌种分刮入装有 25ml 烷烃种子培养基的 250mL 三角瓶中，于 28—30℃ 220 转/分的旋转摇床上培养 40—48 小时，作为摇瓶发酵种子或者取两支上述培养好的 P—12—242 菌种全部刮入装有 500mL 培养基的 5000ml 三角瓶中，于 180 转/分旋转摇床上 28—30℃ 培养 44—48 小时，作为一级种子罐的种子。

用本发明的 P—12—242 菌株生产长链二羧酸，特别是十三碳二羧酸的具体方法是：把发酵的种子接入 PH5.5—9.0，最好为 6.5—7.5 的含有 15—45% (V/V) 的 C_{11} — C_{18} 的正烷烃和 85—55% (V/V) 发酵培养基的混合液中。发酵培养基的组成为：碱金属磷酸盐 6—14g/L，最好为 7—10g/L，氯化钠 0.5—2.0g/L、酵母膏 1—6g/L，最好为 3—5g/L，玉米浆 0.5—2g/L，尿素 0.5—2.5g/L 最好为 1.0—2.0g/L，硝酸盐 5—15g/L，最好为 6—12g/L，蔗糖 10—30g/L，最好为 10—20g/L，消泡剂 400—1200ppm 以及一些其他公知的营养源，在 PH5.8—7.5 之间将上述混合物在 25—30℃，最好在 27—31℃ 通气发酵 48—170 小时。28 小时内，PH 控制在 6.8 以下，以菌体生长为主，产酸为付，此时菌株生长光密度 OD 达到 0.6 左右，产酸达到 20—30g/L，在 28—60 小时，PH 控制在 7.3 以下，产酸为主，菌体生长为付，此时 OD 达至 0.9 左右，产酸达到 75—85g/L，从 60 小时以后，每隔 6—8 小时用 N_2OH 溶液调一次 PH 至 7.5—8.0，菌体量不再增加，而产酸量继续迅速增加，然后将产生的二羧酸从发酵液中分离出来。在发酵开始时，混合液中正烷烃含量为 10—20% (V/V)，以后在适当时间补加正烷烃，使发酵液中正烷烃浓度始终 >5% (V/V) 为准。碱金属磷酸盐可从 KH_2PO_4 ， $\text{N}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ， K_2HPO_4 和 N_2HPO_4 中选一种。硝酸盐可从钾或钠盐中选一种。

发酵结束后，加入适量的水，加碱至 PH10—12，加热至 85—90°C，进行破乳分层，上层为残油，回收再用，放出中间清液，下层菌体层再处理一次或压滤或离心，合并清液，加入适量活性炭，在 85—90°C，脱色 30 分钟，除去活性炭后，脱色液加热至 60—70°C，加 HCl 或 H₂SO₄ 至 PH4—5 进行酸化结晶，冷却至 30°C 后，压滤，用空气吹干，60°C 烘干，得白色十三碳二羧酸结晶。

用本发明的 P—12—242 菌株和发酵方法，可生产 C₁₁—C₁₈ 的各种单一和混合二羧酸。其中在 2.5 吨罐上，从正十三烷发酵生产十三碳二羧酸，发酵 6 天，产酸量高达 180—200g/L，后处理总收率达到 80%，纯度达到 96% 以上。

实例一

- (1)、取一接种环 P—12—242 菌种，涂布在 15×180 大试管麦芽汁固体斜面上，30 °C 培养两天。
- (2)、取上述菌种一支，接入装有 25ml 烷烃种子培养基的 250ml 三角瓶中于 30 °C 在 220 转/分的旋转摇床上培养 48 小时。烷烃种子培养基中 KH₂PO₄ 8g/L，酵母膏 5g/L，玉米浆 3g/L，蔗糖 5g/L，尿素 3g/L，重蜡 50ml/L，自来水配制，PH5.0。
- (3)、在装有 15ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中，接入 3.5ml 上述种子液，在 200 转/分旋转摇床上发酵 4 天，每 24 小时用 N₂OH 调一次 PH 至 7.5—8.0。发酵培养基含 KH₂PO₄ 8g/L，酵母膏 2g/L，玉米浆 1g/L，氯化钠 1.5g/L，尿素 1g/L，正十三烷 200ml/L，泡敌 500ppm，KNO₃ 7g/L，自来水配制，PH7.5，在 110°C 下灭菌 30 分钟。发酵结束后用 HCl 调 PH 至 3，用 100ml 乙醚提取，除去乙醚，得白色结晶，用标准 N₂OH 溶液滴定，计算二羧酸含量。结果 DC₁₂ 产量为 85.2g/L，经气相色谱分析，DC₁₂ 纯度为 97.46%。

实例 2

按照实例 1 的方法，只是正烷烃用 nC₁₅，结果 DC₁₅ 的产量为 53.6g/L，纯度为 96.81%。

实例 3

按照实例 1 的方法，只是正烷烃用 nC₁₇，结果 DC₁₇ 的产量为 52.0 g/L，纯

度为 97.2%。

实例 4

种子培养基和培养方法同实例 1，发酵培养基为 KH_2PO_4 8g/L， N_2Cl 1g/L，酵母膏 2g/L，玉米浆 1g/L， KNO_3 7g/L，蔗糖 15g/L，泡敌 600ppm，尿素 1.8g/L，正十三烷 200ml/L，自来水配制，PH 7.5，发酵 4 天， DC_{13} 产量为 86.06g/L， DC_{13} 纯度 93.3%。

实例 5

种子培养基和培养方法同实例一，发酵培养基同实例 4。把培养两天，经镜检无杂菌的 400LP—12—242 种液接入装有 1500L 发酵培养基，其中 nC_{13} 300L 经 121°C 灭菌 40 分钟的 2500L 发酵罐中，29°C，200 转/分，罐压 0.8Kg/cm²，通气量 1:0.8，28 小时以前，PH 控制在 6.8 以下，28—60 小时，PH 控制在 7.3 以下，60 小时后每隔 8—6 小时，用 N_2OH 溶液调一次 PH 至 7.5，从第三天开始，每天补加正十三烷 120L，共 3 次，发酵 6 天多（161 小时），发酵清液中十三碳二羧酸含量为 205g/L。发酵结束后，加入 300L 自来水，加热至 80°C，加碱调 PH 至 11，冷却降温至 50°C，放入分层罐中静置分层一天，放出上层残油，回收使用，下层菌层通过压滤，除去菌体，滤清液与中层清液合并，加入 0.7% 活性炭，90°C 脱色 15 分钟，压滤除去活性炭，脱色滤清液打入酸化罐中，加水至 DC_{13} 浓度为 4%，加热至 70°C，加入浓 HCl 酸化至 PH 3，冷却降温至 30°C 左右，板框压滤，空气吹干，固形物在 60°C 烘干，得白色 DC_{13} 249 Kg，转化率 94.0%，纯度为 96.7%。

THIS PAGE BLANK (USPTO)